

КЛЕТочНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ХРОНИЧЕСКОГО НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ

СЕРГЕЕВА Т.Н., СЕРГЕЕВ В.Г., ЧУЧКОВ В.М.

CELL MECHANISMS OF CHRONIC NEUROINFLAMMATION

SERGEYEVA T.N., SERGEYEV V.G., CHUCHKOV V.M.

Кафедра анатомии и физиологии человека и животных (зав. кафедрой – профессор И.В.Проничев) ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет» Минобрнауки РФ, г. Ижевск.

Нейровоспаление, которое рассматривается как ключевое звено патогенеза нейродегенеративных заболеваний, как правило, развивается задолго до гибели нейронов. Для выявления молекулярных и клеточных механизмов, обеспечивающих персистенцию нейровоспаления, предшествующее нейродегенерации, мы исследовали отсроченные эффекты однократного введения бактериального эндотоксина (липолисахарида) в область черной субстанции мозга крыс. Через 8 недель, в области введения наблюдалось увеличение количества микроглиоцитов с высокой экспрессией МНС II, и астроцитов, интенсифицирующих экспрессию глиального фибриллярного кислого белка. Ярко выраженная сосудистая реакция сопровождалась индукцией синтеза в клетках стенки кровеносных сосудов фактора некроза опухоли- α , и миграцией лимфоцитов в паренхиму мозга. Полученные результаты обсуждаются с точки зрения системной организации сетевых взаимодействий между описанными клетками.

Ключевые слова: *нейровоспаление, нейродегенерация, микроглиоциты, астроциты, лимфоциты, перicyты*

Neuroinflammation can develop long before the death of neurons. We investigated the deferred effects of a lipopolysaccharide single injection in the rat substantia nigra to identify the molecular and cellular mechanisms of persistent neuroinflammation. After 8 weeks, there was a large number of microglia and astrocytes with high expression of MHC II and glial fibrillary acidic protein, respectively. The observed reaction is accompanied by the induction tumor necrosis factor- α in the walls of blood vessels and migration of lymphocytes into the brain parenchyma. These results are discussed in terms of the systemic organization of the cells network.

Keywords: *neuroinflammation, neurodegeneration, microglia, astrocytes, lymphocytes, pericytes*

Введение. Нейровоспаление – ключевое звено патогенеза нейродегенеративных заболеваний [1, 2]. Ведущую роль в процессах нейровоспаления играют активированные микроглиоциты [3-7]. Секретируемые ими провоспалительные факторы, такие как цитокины (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли- α), монооксид азота, простагландины, специфические протеазы и свободнорадикальные производные кислорода, [8,9] индуцируют окислительный стресс в нейронах, который ведет к их повреждению и гибели.

Экспериментальные и клинические наблюдения свидетельствуют о том, что манифестации многих нейродегенеративных заболеваний, предшествует длительный этап хронического нейровоспаления [10,11] Остается открытым вопрос о молекулярных и клеточных механизмах, обеспечивающих персистенцию нейровоспаления в нервной ткани в течение длительного времени. С учетом данных о том, что в процесс нейровоспаления могут быть вовлечены, помимо микроглиоцитов, и другие клетки: астроциты, эндотелиоциты и перicyты кровеносных сосудов, а также лимфоциты, мигрирующие в нервную ткань [12-14], логично полагать, что в основе хронического нейровоспаления лежат самоподдерживающиеся патофизиологические циклы, обусловленные взаимодействием этих клеток.

Для выявления паттерна активирующихся при хроническом нейровоспалении клеток, и идентификации возможных молекулярных механизмов, лежащих в основе такого рода активации, мы исследовали отсроченные эффекты однократного введения бактериального эндотоксина в область черной субстанции (ЧС) мозга крыс. Выбор этой области представляет интерес с точки зрения исследования патофизиологических процессов, лежащих в основе гибели дофаминергических нейронов и развития болезни Паркинсона.

Цель исследования - выяснить молекулярные и клеточные механизмы персистирующего нейровоспаления в головном мозге крыс.

Материал и методы исследования. Эксперименты проведены на 16 самцах крыс линии Вистар, весом 220 - 300 г., которые содержались в стандартных условиях Все экспериментальные

манипуляции осуществлялись в соответствии с международными нормами этического обращения с животными. Крыс наркотизировали диэтиловым эфиром, освобождали поверхность черепа от мягких тканей, и при помощи бормашины высверливали отверстие по координатам: 5,2 мм каудальной брегмы и 2 мм латеральной осевого шва. При помощи стереотаксического аппарата вводили стеклянную микроканюлю с диаметром кончика 100 мкм на глубину 7,2 мм вентральной уровня твердой мозговой оболочки. Инъекцировали 2 мкл липополисахарида *Escherichia Coli* (Sigma, USA) в концентрации 0,01мкг/мкл (8 животных) или 2 мкл стерильного физиологического раствора (8 животных). Через 8 недель животных наркотизировали диэтиловым эфиром, перфузировали через восходящую аорту физиологическим раствором на фосфатном буфере, затем 4% параформальдегидом, приготовленном на забуференном физиологическом растворе (pH 7,2-7,4). Извлекали мозг, переносили на сутки в 25% раствор сахарозы и замораживали на сухом льду. При помощи криотома (Shandon Cryotom E; Eng) получали серийные срезы мозга толщиной 14 мкм и монтировали их на предметных стеклах Superfrost Plus (Fisher Scientific, USA).

О провоспалительных реакциях нервной ткани судили по результатам рутинного окрашивания срезов крезильным фиолетовым и иммуногистохимического окрашивания с использованием первичных антител к тирозингидроксилазе (мышинные IgG, 1:2000; SantaCruz), молекулам главного комплекса гистосовместимости второго класса (мышинные IgG, 1:1000; Abcam), глиальному фибриллярному кислому белку (мышинные IgG, 1:1000; SantaCruz), кластеру дифференцировки лимфоцитов (мышинные IgG, 1:1000; Abcam), транскрипционному фактору FoxP3 (мышинные IgG, 1:1000; Abcam), фактору некроза опухоли - α (мышинные IgG, 1:1000; Abcam). Подсчет количества меченых клеток в ЧС производили при помощи флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse E200, совмещенного с цифровой камерой MicroPublisher 3.0 (USA), и компьютерной программы ImagePro Insight 8.0 (Media Cybernetics, USA). Результаты исследований проверяли на нормальность распределения значений с помощью W-теста Шапиро-Вилкоксона. Сравнение выборок проводили с помощью t- критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $P < 0,05$. Результаты представляли, как $M \pm m$ (среднее \pm стандартное отклонение). Статистический анализ проводили в компьютерной программе Statistica 10.0.

Результаты исследования и их обсуждение. Через 8 недель после однократной инъекции ЛПС в область ЧС мы не обнаруживали в ней па-

дения количества дофаминергических нейронов, но наблюдали целый ряд морфофункциональных изменений, свидетельствующих о наличии нейровоспалительного процесса. На срезах, окрашенных крезильным фиолетовым, область введения ЛПС отличалась выраженной сосудистой реакцией (рис. 1) и цитозом, наблюдаемым как в ретикулярной (ЧСр), так и компактной (ЧСк) части черной субстанции. Кровеносные сосуды имели увеличенный диаметр; в просвете сосудов и в непосредственной близости от них локализовались в большом количестве небольшие клетки с округлым ядром и узким ободком цитоплазмы, фенотип которых был схож с лимфоцитарным.

Иммуногистохимическое исследование срезов с использованием антител против молекул МНС II продемонстрировало увеличение в ЧС количества микроглиоцитов, интенсивно экспрессирующих этот маркер ($+178,2 \pm 24,2\%$), относительно животных, которым в ЧС вводился стерильный физраствор. Введение ЛПС приводило также к значительному увеличению количества клеток, интенсивно экспрессирующих глиальный фибриллярный кислый белок ($+255,2 \pm 43,2\%$), что свидетельствовало о реактивном астроглиозе, сохраняющемся в нервной ткани через 8 недель после однократной инъекции бактериального эндотоксина.

В клетках стенки кровеносных сосудов и периваскулярной области ЧС экспериментальных животных выявлялись клетки, интенсивно синтезирующие фактор некроза опухоли (ФНО- α). Иммунореактивные клетки в стенке сосудов имели вытянутую форму с отростками, преимущественно ориентированными по окружности сосуда. Такая форма и тот факт, что они не контактировали с внутренним просветом сосуда, позволили предположить, что данные клетки могли быть перицитами. Известно, что перициты в ответ на инфицирование, стимуляцию ЛПС и цитокинами способны синтезировать хемокины и провоспалительные цитокины, в том числе ФНО- α [15, 16].

Особенно интересным представляется обнаружение вокруг сосудов клеток с высокой экспрессией ФНО- α , фенотип которых был схож с микроглиоцитарным. Как известно, активированные микроглиоциты, способны синтезировать наряду с другими провоспалительными цитокинами и ФНО- α [17]. Расположение в непосредственной близости друг от друга вышеописанных клеток позволяет говорить о наличии взаимных стимулирующих влияний, опосредуемых провоспалительными цитокинами.

Сосудистая реакция, индукция синтеза ФНО- α клетками стенки кровеносных сосудов, и значительное усиление интенсивности свечения иммунореактивного глиального фибриллярного

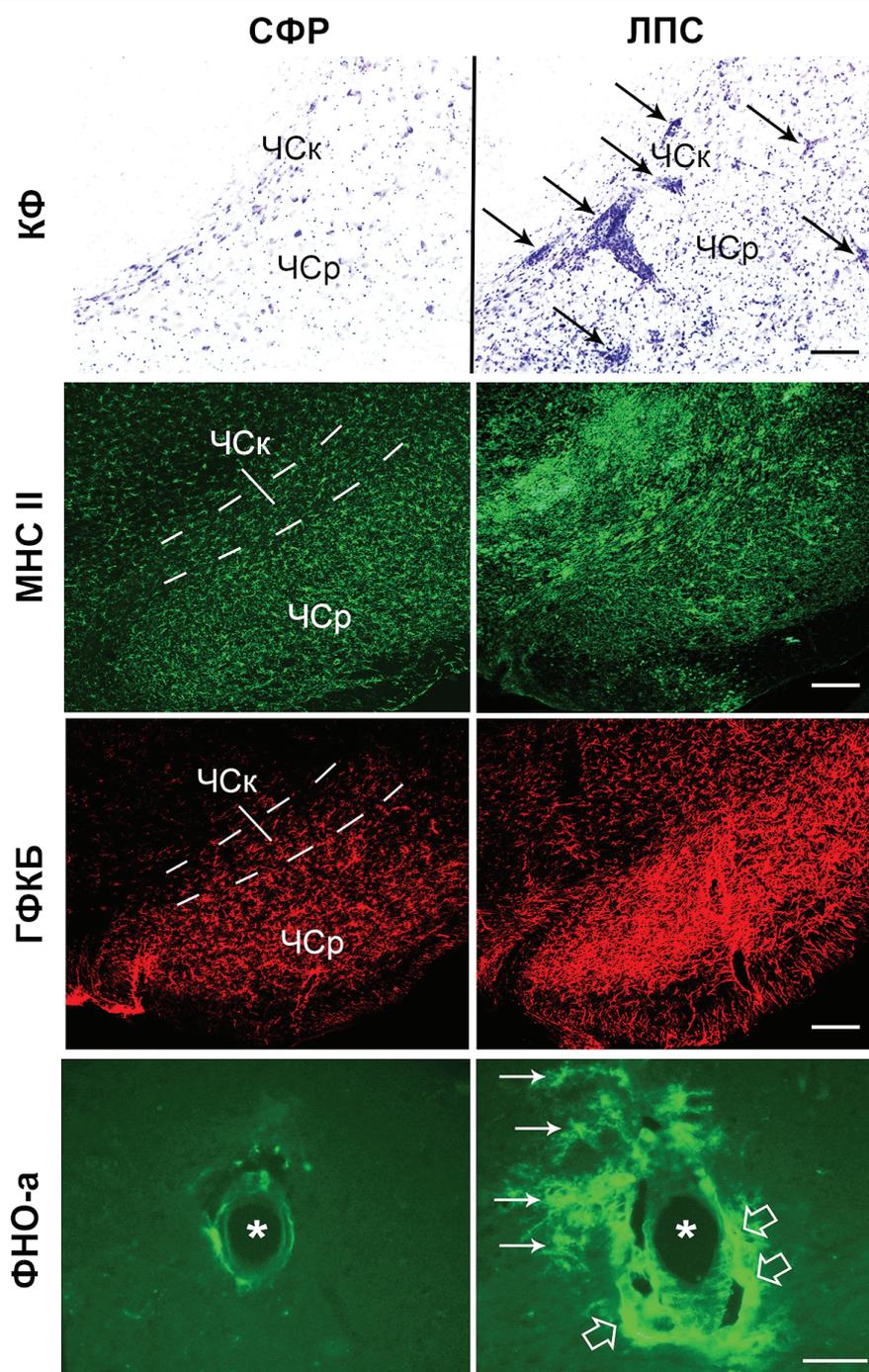


Рис. 1. Морфофункциональные изменения черной субстанции головного мозга крыс через 8 недель после введения в нее стерильного физиологического раствора (СФР) и липополисахарида (ЛПС). На срезах, окрашенных крезильовым фиолетовым (КФ), стрелками выделены расширенные сосуды, содержащие большое количество клеток с лимфоцитарным фенотипом. Иммуногистохимическое мечение свидетельствует об увеличении количества и интенсивности экспрессии иммунопозитивного сигнала в клетках, иммунореактивных к молекулам главного комплекса гистосовместимости (МНС II) и глиальному фибриллярному кислом белку (ГФКБ) после введения ЛПС. Эндотоксин индуцирует синтез фактора некроза опухоли- α (ФНО- α) в клетках микроглиоцитарного (тонкие стрелки) и перичеситарного (контурные крупные стрелки) фенотипа. Обозначения: ЧСк – компактная часть черной субстанции; ЧСр – ретикулярная часть черной субстанции; звездочки – просвет кровеносных сосудов. Длина линии для КФ = 200 мкм; для МНС II и ГФКБ = 220 мкм; для ФНО- α = 100 мкм.

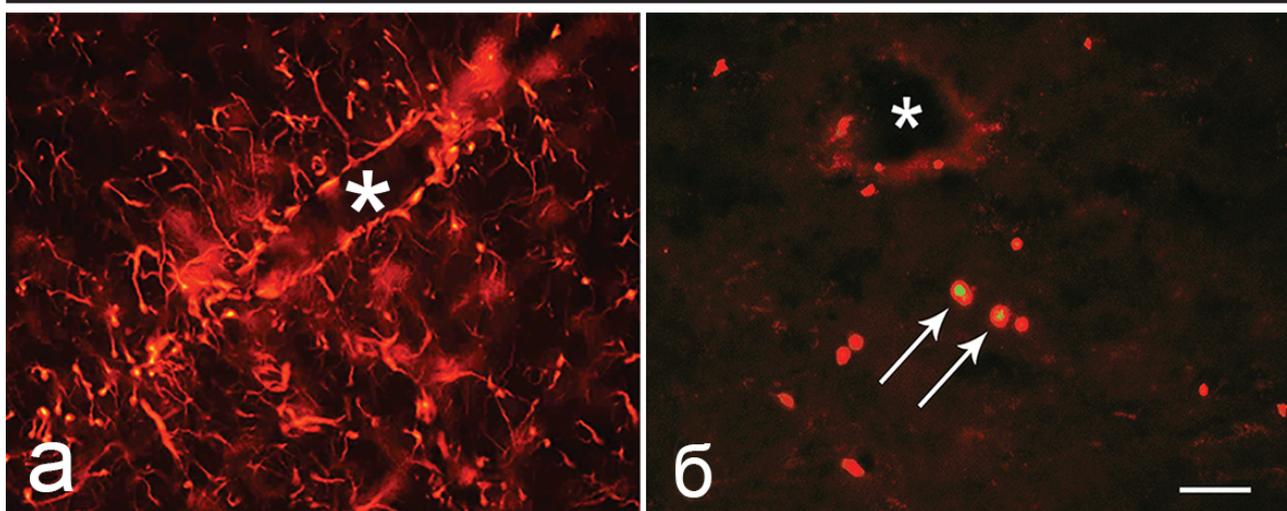


Рис. 2. Экспрессия иммунореактивного глиального фибриллярного кислого белка в астроцитарных отростках, контактирующих с кровеносными сосудами (а), и двойное иммуногистохимическое мечение клеток, экспрессирующих лимфоцитарный маркер CD3 (красное окрашивание) и FoxP3 (зеленое окрашивание) в черной субстанции через 8 недель после введения ЛПС. Стрелками обозначены клетки с двойной меткой, звездочками - просветы сосудов. Длина линии = 100 мкм.

кислого белка в отростках астроглиоцитов, образующих своеобразную муфту вокруг сосудов (рис. 2а), позволило предположить, что в описываемых экспериментальных условиях повышается проницаемость гематоэнцефалического барьера. В пользу этого свидетельствовало наличие клеток, экспрессирующих лимфоцитарный маркер (CD3) не только в просвете сосудов, но и паренхиме нервной ткани (Рис. 2б). Ранее исследователями было показано, что микроглиальная активация в повреждаемых областях мозга ведет к локальному повышению пропускной способности ГЭБ и инфильтрации в эти области лимфоцитов [18]. Недавние исследования показали, что, в свою очередь, инфильтрирующие нервную ткань Т-лимфоциты оказывают стимулирующее воздействие на микроглиоциты, усиливая нейровоспаление и нейродегенерацию [19].

Вместе с тем, двойное иммуногистохимическое мечение позволило нам выявить в ядрах части лимфоцитов, мигрировавших в нервную ткань, транскрипционный фактор FoxP3 (Рис.2б), являющийся маркером регуляторной популяции лимфоцитов (Трег), активность которых, как свидетельствуют данные литературы, направлена на ингибирование воспалительного процесса. Ранее было показано, что Трег способны мигрировать в область повреждения и через прямое взаимодействие с локальной глией, снижать нейровоспаление и, таким образом, оказывать нейропротекцию. В частности, Трег могут супрессировать опосредованное микроглиоцитами нейровоспаление посредством снижения производства в них ре-

активных форм кислорода и активности NF-κB, а также индуцировать Fas-FasL-опосредованный апоптоз активированных микроглиоцитов [20].

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что однократное введение ЛПС в ЧС, индуцирует в этой области персистирующее нейровоспаление, в которое вовлекаются перициты, микроглиоциты, астроциты и, мигрирующие в нервную ткань лимфоциты. Наличие описанных в литературе прямых межклеточных контактов и дистантной паракринной регуляции между ними, позволяет рассматривать совокупность клеток, участвующих в реакциях на действие повреждающего фактора как функциональную систему (которую мы предлагаем обозначить как нейроглиоваскулярная единица). Активность такой микросистемы изначально направлена на обеспечение защиты нейронов в условиях угрозы их повреждения и гибели. Однако наличие большого количества петель обратной связи между элементами нейроглиоваскулярной единицы (рис. 3) ведет к персистированию воспалительного процесса в ней, даже после однократной стимуляции. Такое провоспалительное состояние может служить предрасполагающим фактором для инициации гибели нейронов при дополнительном воздействии внешних повреждающих факторов. Становится очевидным, что поиск новых подходов к терапии нейродегенеративных заболеваний должен базироваться на рассмотрении в качестве терапевтической мишени не отдельных клеток, а интегральной нейроглиоваскулярной системы.

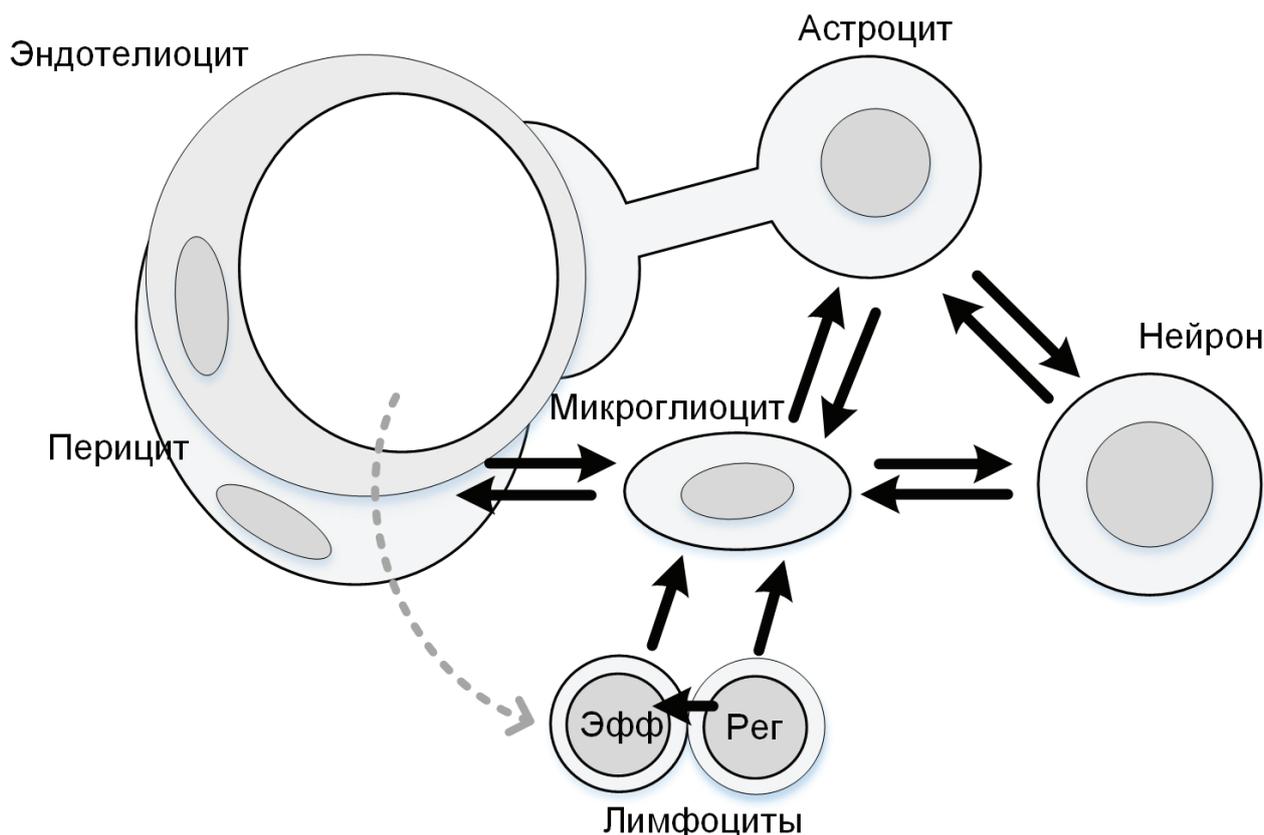


Рис. 3. Схема взаимодействий клеток, формирующих нейроглиоваскулярную единицу.

Заключение. Через 8 недель после однократного введения ЛПС в ЧС, в ней отсутствуют признаки выраженной нейродегенерации, но обнаруживаются признаки нейровоспаления: астроцитоз и микроглиоцитоз, повышенная экспрессия этими клетками, соответственно, молекул МНС II и глиального фибриллярного кислого белка, индукция синтеза в стенке кровеносных сосудов фактора некроза опухоли - α , и интенсивная миграция в нервную ткань лимфоцитов. Хронический характер нейровоспаления, вызванный однократной инъекцией ЛПС, свидетельствует о наличии в изучаемой области мозга самоподдерживающегося патофизиологического механизма активации, основанного на взаимодействии этих клеток.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Vivekanantham S., Shah S., Dewji R., Dewji A., Khatri C., Ologunde R. Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair // *Int J Neurosci*. 2014. Vol.3. P.1-17.
2. Ellwardt E., Zipp F. Molecular mechanisms linking neuroinflammation and neurodegeneration in MS // *Exp Neurol*. 2014. Vol.262. P.8-17
3. Orr C.F., Rowe D.B., Halliday G.M. An inflammatory review of Parkinson's disease // *Prog Neurobiol*. 2002. Vol. 68, №5. P.325-340.
4. McGeer P.L., McGeer E.G. Glial reactions in Parkinson's disease // *Mov Disord*. 2008. Vol.23, №4. P. 474-483.
5. Gao H.M., Hong J.S. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression // *Trends Immunol*. 2008. Vol.29, №8. P.357-365.
6. Hirsch E.C., Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? // *Lancet Neurol*. 2009. Vol. 8, №4. P.382-397.
7. Griffin W.S. Inflammation and neurodegenerative diseases // *Am J Clin Nutr*. 2006. Vol.83, №2. P. 470-474.
8. Jha M.K., Suk K. Management of glia-mediated neuroinflammation and related patents // *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2014. Vol.8, №2. P.118-124.
9. Suk K. Glial proteins and peptides: implications in neuroinflammation // *Curr Protein Pept Sci*. 2013. Vol. 14, №1. P.2-10.
10. Majde J.A. Neuroinflammation resulting from covert brain invasion by common viruses - a potential role in local and global neurodegeneration // *Med Hypotheses*. 2010. Vol.75, №2. P.204-213.
11. Lyman M., Lloyd D.G., Ji X., Vizcaychipi M.P., Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences // *Neurosci Res*. 2014. Vol.79. P.1-12.

12. Niranjan R. *The role of inflammatory and oxidative stress mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease: focus on astrocytes* // *Mol Neurobiol*. 2014. Vol. 49, №1. P. 28-38.
13. Monahan A.J., Warren M., Carvey P.M. *Neuroinflammation and peripheral immune infiltration in Parkinson's disease: an autoimmune hypothesis* // *Cell Transplant*. 2008. Vol. 17, №4. P. 363-372.
14. Winkler E.A., Bell R.D., Zlokovic B.V. *Central nervous system pericytes in health and disease* // *Nat Neurosci*. 2011. Vol. 11, P. 1398-1405.
15. Alcendor D.J., Charest A.M., Zhu W.Q., Vigil H.E., Knobel S.M. *Infection and upregulation of proinflammatory cytokines in human brain vascular pericytes by human cytomegalovirus* // *J Neuroinflammation*. 2012. Vol. 9, P. 95-104.
16. Jansson D., Rustenhoven J., Feng S., Hurley D., Oldfield R.L., Bergin P.S., Mee E.W., Faull R.L., Dragunow M. *A role for human brain pericytes in neuroinflammation* // *J Neuroinflammation*. 2014. Vol. 11, P. 104-112.
17. Gayle D.A., Ling Z., Tong C., Landers T., Lipton J.W., Carvey P.M. *Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopamine cell loss in culture: roles of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and nitric oxide* // *Brain Res Dev Brain Res*. 2002. Vol. 133, №1. P. 27-35.
18. Racke M.K., Ratts R.B., Arredondo L., Perrin P.J., Lovett-Racke A. *The role of costimulation in autoimmune demyelination* // *J Neuroimmunol*. 2000. Vol. 107, №2. P. 205-215.
19. Brochard V., Combadiere B., Prigent A., Laouar Y., Perrin A., Beray-Berthet V., Bonduelle O., Alvarez-Fischer D., Callebert J., Launay J.M., Duyckaerts C., Flavell R.A., Hirsch E.C., Hunot S. *Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease* // *J Clin Invest*. 2009. Vol. 119, P. 182-192.
20. Reynolds A.D., Banerjee R., Liu J., Gendelman H.E., Mosley R.L. *Neuroprotective activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in an animal model of Parkinson's disease* // *J Leukoc Biol*. 2007. Vol. 82, №5. P. 1083-1094.

Авторская справка:

1. Сергеева Татьяна Николаевна, доцент кафедры анатомии и физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», 426011 г. Ижевск, ул. Холмогорова д. 29, кв. 117, 8-912-4471591, tnbio@ya.ru
2. Сергеев Валерий Георгиевич, профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», доктор биологических наук, 426011 г. Ижевск, ул. Холмогорова 29-117, 8-912-4657339, cellbio@ya.ru
3. Чучков Виктор Михайлович, профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных ФГБОУ ВПО «Удмуртский государственный университет», доктор медицинских наук, 426034 г. Ижевск, ул. Пушкинская 206-4, 8-912-7660990, comnayk@mail.ru